

2F06

ライン共焦点顕微鏡によるタンパク質の構造形成運動の一分子蛍光観察
(東北大学・多元研) ○高橋 聡、齊藤 雅嵩、鎌形 清人、小井川 浩之

Single molecule fluorescence investigation on the folding process of proteins based on line confocal microscopy

(IMRAM, Tohoku University) ○Satoshi Takahashi, Masataka Saito,
Kiyoto Kamagata, Hiroyuki Oikawa

タンパク質は、アミノ酸が一次的につながった高分子鎖であり、無数の構造を持つ変性状態から、唯一の構造を持つ折り畳まれた状態に構造形成する（フォールディングする）能力をもつ。タンパク質フォールディングの分子機構を理解することで、タンパク質の構造予測やデザインなどに役立つ知見が得られると期待される。多くのタンパク質のフォールディングは協同的に起こり、変性した状態と折り畳まれた状態の二状態を仮定することで説明が可能である。この事実は、変性タンパク質が持つ多数の構造間に速い交換があるために平均化が起こり、変性状態が単一の状態と見なせるからと理解される。一方で、変性タンパク質の運動性や構造特性について、互いに矛盾するデータが報告されコンセンサスが得られない状況が続いているほか、フォールディング転移の協同性が成立する根拠に疑問が持たれる場合もある。

変性タンパク質の物性に関して様々な議論がなされている[1]。第一の議論点は、変性したタンパク質の大きさに関するものである。X線小角散乱法によると、変性したタンパク質の回転半径は大きく、変性剤がない溶液中においてもコイル状態の高分子鎖に期待される大きさを保っている。一方で、一分子蛍光観察法による二残基間の距離測定によると、変性剤が存在しない環境下における変性タンパク質の回転半径は小さいことが推定される。第二の議論点は、変性したタンパク質が変性状態内において示す揺らぎ運動の時定数に関するものである。蛍光相関分光法を用いることで、変性したタンパク質にラベルした二つの蛍光色素間の揺らぎ運動は数十ナノ秒の時定数を持つことが測定されている。一方で、マイクロ秒やミリ秒の時間領域におけるゆっくりした揺らぎ運動が示唆されるデータも報告されている。第三の議論点は、変性したタンパク質の不均一性に関するものである。変性したタンパク質は、ランダムで多数の構造を持つけれども、異なる構造間の交換の時定数が十分に短い場合は、平均構造のみが観察されるはずである。一方で、変性タンパク質の二残基間の距離として、一分子蛍光観察法では広い分布が観察されることが多い。従来の一分子蛍光観察法の時間分解能が数ミリ秒程度であることを考えると、変性タンパク質にはミリ秒以上の寿命を持つ構造の不均一性が残っていることを示唆する。

我々は、蛍光一分子分光法を用いることで、タンパク質のフォールディング運動の解明に取り組んできた。我々の手法の特徴は、ライン共焦点顕微鏡という独自の計測手段により、一分子連続蛍光測定における時間分解能を従来の数ミリ秒から数十マイクロ秒にまで短縮したことである[2]。また、一

分子蛍光測定における構造情報の分解能も劇的に向上させた。この装置を用いることで、従来法では解明が難しかった変性タンパク質における構造、揺らぎ運動の時定数、さらに、不均一性等について知見が得られると期待される。

ユビキチンについて得られた結果の例を説明する[3]。76 残基長のユビキチンの 1 番目と 65 番目のアミノ酸に異なる蛍光色素を部位特異的にラベル化した試料について、色素間の励起状態移動 (FRET) 効率を一分子レベルで測定し、変性剤濃度の異なる溶液中における効率分布を測定した。変性剤濃度が低い場合には、効率 0.8 付近に折り畳まれた状態にアサインできるピークが観察された。このピークの線幅は狭く、構造が均一であることが示された。一方で、変性剤濃度が高い場合には、FRET 効率が 0.4 から 0.6 にわたり幅広いピークが観察された。このピークは変性状態にアサインできるが、データを 1ms の時間幅で平均化した後のピークの線幅が、単一構造を仮定した場合のノイズ幅よりも明らかに広がった。この事実は、ユビキチンの変性状態において構造の不均一性が存在すること、さらに、不均一な構造間の転移がミリ秒以上のゆっくりした時定数で起きることを示している。

変性状態のタンパク質における不均一性とゆっくりした構造揺らぎは、プロテイン A の B ドメインにおいても観察された[4]。また、他のタンパク質についても類似した現象が示唆されている。一方で、変性したタンパク質において、非常に速い構造の交換が起きることも確立された観察事実である。幾つものタンパク質で、タンパク質にラベル化した色素間の距離が数十ナノ秒の時間領域で揺らぐことが観察されている。速い構造揺らぎが起きることと同時に、なぜミリ秒よりも長い寿命を持つ構造の不均一性が観察されるのだろうか？

我々は、変性したタンパク質の主鎖の収縮と伸張を伴う大規模な運動はマイクロ秒以下の時定数で起きるものの、ペプチド鎖の局所的な構造の寿命は長く、ラベル化を導入した色素周辺の構造の不均一性を引き起こすのではないかと解釈した。蛍光相関分光法で観察された速い揺らぎは前者を、我々が観察した遅い揺らぎは後者を観察したものであり、変性タンパク質の運動の異なる側面を捉えたものであると解釈した。

我々の提案が正しければ、変性剤が低濃度の条件において、局所的な構造転移の時定数がユビキチンのフォールディングの時定数よりも長い値になる可能性がある。今後、一分子蛍光観察装置と溶液混合装置を組み合わせることで、より詳しい解析が可能になると思われる。また、我々の観測の時間分解能をさらに向上させることも重要な課題である。これらの試みについても報告する。

引用文献

- [1] Takahashi, S.; Kamagata, K.; Oikawa, H. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *36*, 1–9.
- [2] Oikawa, H.; Suzuki, Y.; Saito, M.; Kamagata, K.; Arai, M.; Takahashi, S. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 2151.
- [3] Saito, M.; Kamonprasertsuk, S.; Suzuki, S.; Nanatani, K.; Oikawa, H.; Kushiro, K.; Takai, M.; Chen, P.-T.; Chen, E. H.-L.; Chen, R. P.-Y.; Takahashi, S. *J. Phys. Chem. B* **2016**, *in press*.
- [4] Oikawa, H.; Kamagata, K.; Arai, M.; Takahashi, S. *J. Phys. Chem. B* **2015**, *119*, 6081–6091.